



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

REC'D 11 FEB 2004

WIPO

PCT

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 • 7 / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 28 OCT 2002 INPI LIEU 0213428 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 28 OCT. 2002		<input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE bioMérieux A l'attention de Mme Valérie BITAUD Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE	
Vos références pour ce dossier (facultatif) NGFdose			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE DE DOSAGE DU NGF POUR LE DIAGNOSTIC IN VITRO DU CANCER DU SEIN ET UTILISATION EN THERAPIE			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		bioMérieux	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN		16173161210131919	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	Chemin de l'Orme	
	Code postal et ville	1619218101 MARCY L'ETOILE	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		04.78.87.52.53 N° de télécopie (facultatif) 04.78.87.21.16	
Adresse électronique (facultatif)		anneloes.tuzet@eu.biomerieux.com	
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page



23 OCT 2002
REMISE DES PIÈCES
DATE 69 INPI LYON
LIEU 0213428
N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

6. MANDATAIRE (facultatif)		
Nom	BITAUD	
Prénom	Valérie	
Cabinet ou Société	bioMérieux	
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	PG 10872	
Adresse	Rue	Chemin de l'Orme
	Code postal et ville	16 09 12 18 10 MARCY L'ETOILE
	Pays	France
N° de téléphone (facultatif)	04.78.87.23.19	
N° de télécopie (facultatif)	04.78.87.21.16	
Adresse électronique (facultatif)	valerie.bitaud@eu.biomerieux.com	
7. INVENTEUR(S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes	<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8. RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Palement échelonné de la redevance (en deux versements)	Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9. RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG <input type="text"/>
10. SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11. SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Valérie BITAUD Ingénieur Brevets PG 10872		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI D. GIRAUD



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



28 OCT 2002
REMISE DES PIÈCES
DATE **69 INPI LYON**
LIEU **0213428**
N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 © W / 010702

Vos références pour ce dossier (facultatif)		NGFdose	
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation	
		Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N°	
		Pays ou organisation	
		Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N°	
		Pays ou organisation	
		Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N°	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cocher l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE Laboratoire de Biologie du Développement	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville	519161515 VILLENEUVE D'ASCQ	
	Pays	France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cocher l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Valérie BITAUD Ingénieur Brevets PG 10872 	
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

La présente invention concerne le domaine de la cancérologie. Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un procédé de diagnostic du cancer du sein chez un patient humain par détermination de la présence du facteur de croissance nerveux (NGF) dans un échantillon biologique issu de ce patient.

5 Chez la femme, le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer dans les pays industrialisés. Le test disponible et utilisé en dépistage de masse pour le cancer du sein est une technique d'imagerie : la mammographie. Grâce à cette technique, la mortalité due aux cancers du sein a fortement diminué (30% de réduction de mortalité), ce qui souligne l'importance du dépistage des tumeurs en terme de santé
10 publique. Néanmoins, les techniques de dépistage souffrent d'un certain nombre de handicaps. La mammographie nécessite un matériel performant et du personnel qualifié ce qui est coûteux dans le cadre d'un dépistage de masse. Les cancers du sein se développent lentement, il est estimé que la taille minimum d'une tumeur repérable par mammographie est de 1 cm. Cette tumeur de petite taille présente cependant un passé
15 évolutif de 8 ans en moyenne lors du diagnostic. L'étiologie du cancer du sein n'est pas bien définie. Des prédispositions familiales ont été mise en évidence. L'âge est le facteur de risque le plus important. Ainsi, le risque augmente de 0,5% par année d'âge dans les pays occidentaux. D'autres facteurs de risques sont connus tels que le nombre des grossesses et l'âge de la première grossesse, l'allaitement, l'âge de la puberté et de
20 la ménopause, les traitements oestrogéniques après la survenue de la ménopause, le stress et la nutrition.

En pratique clinique, la caractérisation d'une tumeur en terme de malignité est réalisée après sa découverte par des méthodes histologiques dans des laboratoires spécialisés. Un ensemble de paramètres tels que la taille de la tumeur, son grade
25 histopathologique, l'inflammation associée et l'invasion ganglionnaire sont utilisés pour décider de la thérapeutique et pour estimer le pronostic de la maladie.

Des marqueurs qui permettent de distinguer les cellules tumorales des cellules saines sont recherchés et étudiés depuis des années pour le cancer du sein. Ils permettraient de diagnostiquer précocement la maladie, d'en établir le pronostic et la
30 sensibilité au traitement, et d'en surveiller l'évolution. Jusqu'à présent les marqueurs candidats qui ont été identifiés et étudiés ont été des oncogènes, des marqueurs

tissulaires et des marqueurs associés à l'angiogénèse ou aux capacités métastatiques de la tumeur. Actuellement les marqueurs de cancer du sein identifiés servent principalement pour le suivi thérapeutique. Il n'existe pas de test biologique validé pour le diagnostic précoce, ni pour le dépistage du cancer du sein. Seule la détection des récepteurs aux œstrogènes sur le tissu tumoral permet de déterminer si les tumeurs
 5 seront ou non hormono-sensibles.

Un nombre limité de marqueurs antigéniques, en particulier le CA 15-3 (Basuyau, J. P., M. P. Blanc-Vincent, J. M. Bidart, A. Daver, L. Deneux, N. Eche, G. Gory-Delabaere, M. F. Pichon, and J. M. Riedinger. 2000. [Standards, Options and
 10 Recommendations (SOR) for tumor markers in breast cancer. SOR Working Group]. Bull Cancer. 87:723-37.) a été identifié dans le cas des cellules mammaires cancéreuses. Ce marqueur est utilisé en pratique courante pour le suivi des patientes, en particulier pour la détection de récurrence, mais en raison de sa faible sensibilité il n'est pas proposé comme test de dépistage ni de diagnostic.

15 Depuis plusieurs années des travaux portant sur les antigènes associés au cancer du sein ont été développés non pas pour rechercher des marqueurs, mais pour rechercher des cibles pour une immunothérapie. Ceux-ci vont de la mise en évidence d'une immunité humorale contre les antigènes T/Tn (Springer, G. F. 1997. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy.
 20 J Mol Med. 75:594-602.), jusqu'à la découverte plus récente d'anticorps et de réponses des cellules T dirigés contre p53 (Gnjatic, S., Z. Cai, M. Viguer, S. Chouaib, J. G. Guillet, and J. Choppin. 1998. Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53 epitope presented by breast carcinomas and melanomas. J Immunol. 160:328-33) et HER-2/neu (Disis, M. L., and M. A. Cheever. 1997. HER-
 25 2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. Adv Cancer Res. 71:343-71).

Plus récemment, une série de nouveaux antigènes potentiels a été mise en évidence par l'approche SEREX (serological expression cloning), reposant sur la construction de bibliothèques d'ADNc de cellules tumorales et un screening par le sérum
 30 autologue. Un screening sérologique de bibliothèque de cancer du sein a ainsi permis la mise en évidence de l'antigène *ING1* (Jager, D., E. Stockert, M. J. Scanlan, A. O. Gure,

E. Jager, A. Knuth, L. J. Old, and Y. T. Chen. 1999. Cancer-testis antigens and ING1 tumor suppressor gene product are breast cancer antigens: characterization of tissue-specific ING1 transcripts and a homologue gene. *Cancer Res.* 59:6197-204.), puis d'un nouvel antigène de différenciation *NY-BR-1*, exprimé selon les auteurs dans 80% des cancers du sein et induisant la production d'anticorps IgG chez les patientes (Jager, D., E. Stockert, A. O. Gure, M. J. Scanlan, J. Karbach, E. Jager, A. Knuth, L. J. Old, and Y. T. Chen. 2001. Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. *Cancer Res.* 61:2055-61). Ce type d'approche, qui a principalement servi à la recherche de cibles potentiellement utilisables pour le développement de vaccins, n'exclut pas *a priori* les antigènes présents dans le tissu normal (c'est le cas de *NY-BR-1*), ni ceux reconnus par un nombre limité de sérums de patientes (2/14 pour *ING1*), ils ne sont donc pas exploitables pour une stratégie de dépistage ou de diagnostic précoce. Par la même approche, d'autres antigènes induisant une réponse immunitaire humorale chez des patientes ont été signalés comme NY-BR-62, NY-BR-85 et la protéine D52. Ces antigènes seraient surexprimés respectivement dans 60%, 90% et 60% des cancers du sein (Scanlan, M. J., and D. Jager. 2001. Challenges to the development of antigen-specific breast cancer vaccines. *Breast Cancer Res.* 3:95-8.).

Les phénomènes moléculaires conduisant au développement d'un cancer du sein impliquent des modifications de la structure et de l'expression d'oncogènes (tel que ras) et de gènes suppresseurs de tumeurs comme p53. La croissance des cellules tumorales dans la plupart des cancers du sein est dépendante des hormones œstrogéniques (œstradiol et progestérone) et de facteurs de croissance qui contrôlent la prolifération, la migration et l'apoptose. Ces facteurs de croissance soit stimulent, soit inhibent la prolifération, migration et différenciation des cellules tumorales de manière à agir de concert pour favoriser la croissance du cancer et les métastases. Par exemple, les facteurs de croissance de type insuline, le facteur de croissance de transformation α (TGF- α) et les facteurs de croissance du fibroblaste (FGF) peuvent tous stimuler la prolifération des cellules du cancer du sein, tandis que l'inhibiteur du facteur de croissance dérivé du sein (MDGI) et le facteur de croissance de transformation β (TGF- β) inhibent leur croissance.

Descamps, S. et al. dans J. Biol. Chem., 276, 17864-17870, 2001, ont démontré que le facteur de croissance NGF, le premier facteur neurotrophique découvert, est également un activateur puissant à la fois pour la survie et la prolifération des cellules du cancer du sein.

5 Le NGF a été isolé à l'origine pour sa capacité à stimuler tant la survie que la différenciation des neurones périphériques, devenant plus tard l'élément archétype de la famille neurotrophique des polypeptides (Levi-Montalcini, R., 1987, Science, 4237, 1154-1162). Une fonction biologique majeure du NGF est le maintien et la survie des neurones post-mitotiques, ce qui fait de lui un candidat important pour le traitement des
10 maladies neurodégénératives. Outre son rôle dans le développement et le maintien des cellules neuronales, le NGF a également des effets significatifs sur les cellules non neuronales. Ainsi, par exemple, il est un facteur de survie autocrine des lymphocytes B (Torcia, M., et al., 1996, Cell, 85, 345-356).

Le NGF génère des signaux intracellulaires par interaction avec deux classes de
15 récepteur de membrane : le produit proto-oncogénique de TrkA p140^{trkA}, qui possède une activité tyrosine kinase intrinsèque, et un deuxième récepteur, p75^{NTR}, qui appartient à la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF). Dans les cellules du cancer du sein, il existe deux voies de signalisation distinctes activées par le NGF. L'effet mitogénique nécessite le récepteur p140^{trkA} et la cascade MAP kinase, tandis que l'effet anti-apoptose dépend du récepteur p75^{NTR} et de l'activation en aval du
20 facteur NF-κB (Descamps, S. et al., 2001, *supra*). Ainsi, pour le diagnostic du cancer du sein, certains auteurs se sont tourné vers la détection des récepteurs au NGF, comme par exemple dans la demande de brevet WO94/06935 qui décrit un procédé de diagnostic d'un état précancéreux ou cancéreux chez un patient par dosage de la
25 quantité du récepteur p75.

L'effet biologique puissant du NGF sur les cellules du cancer du sein soulève également la question de sa distribution dans la glande mammaire et de son origine. On pense généralement que le NGF est produit par des cibles de l'innervation sympathique et sensorielle, bien qu'il n'ait pas été trouvé dans la circulation sanguine (Bonini, S. et
30 al ; 1996, Proc., Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10955-10960).

La demanderesse a maintenant mis en évidence de façon surprenante que les

cellules du cancer du sein produisent elles-mêmes du NGF, tandis que des cellules épithéliales mammaires normales correspondantes n'en produisent pas, de sorte que le NGF peut être utilisé à titre de marqueur tumoral ou bien à titre de cible thérapeutique.

Ainsi, la présente invention a pour premier objet un procédé de diagnostic du cancer du sein par détermination de la présence de NGF dans des échantillons biologiques issus de patients suspectés d'être atteints du cancer du sein.

Le procédé de l'invention permet donc de diagnostiquer le cancer du sein par un test simple consistant à rechercher la présence de NGF dans un échantillon biologique prélevé d'un patient. La demanderesse a montré de façon inattendue que des cellules cancéreuses produisaient du NGF, tandis que les cellules correspondantes non cancéreuses en étaient incapables, comme cela sera mis en évidence de façon plus détaillée ci-après. Ainsi, la détermination de la présence de NGF dans l'échantillon permet de conclure à la pathologie recherchée, l'absence de NGF permettant de conclure à l'absence de pathologie.

On entend par détermination de la présence de NGF soit la détection directe du NGF, soit la culture de cellules sensibles au NGF, soit la détection de l'ARNm du NGF dans l'échantillon biologique.

La détermination de la présence de NGF par détection directe du NGF constitue un mode de réalisation particulier de l'invention.

Par détection directe du NGF, on entend la mise en évidence du NGF lui-même dans l'échantillon biologique.

La détection directe du NGF dans l'échantillon biologique peut être mise en œuvre par tout moyen connu de l'homme du métier, comme par exemple par test immunologique ou par spectrométrie de masse, ce qui constitue un mode de réalisation particulier de l'invention.

Le test immunologique peut être tout test largement connu de l'homme du métier impliquant des réactions immunologiques, à savoir des réactions entre le NGF et un partenaire de liaison spécifique du NGF.

Les partenaires de liaison spécifiques du NGF sont tout partenaire susceptible de se lier au NGF. A titre d'exemple, on peut citer les anticorps, les fractions d'anticorps et toute autre protéine capable de se lier au NGF.

Les anticorps partenaires de liaison sont soit des anticorps polyclonaux, soit des anticorps monoclonaux.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec du NGF, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment le NGF.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec du NGF, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit antigène. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (murines dans l'exemple) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis de l'antigène tumoral d'intérêt pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

Des exemples d'anticorps anti-NGF sont connus et sont disponibles notamment dans le catalogue de R&D Systems.

Les partenaires de liaison spécifiques du NGF seront alors marqués pour la révélation de la liaison NGF/partenaire de liaison et donc pour la détection directe du NGF dans l'échantillon biologique.

Par marquage des partenaires de liaison, on entend la fixation d'un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable. Une liste non

limitative de ces marqueurs consiste en :

- les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la α -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- 5 ◦ les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents, colorants,
- les molécules radioactives comme le ^{32}P , le ^{35}S ou le ^{125}I , et
- les molécules fluorescentes telles que l'alexa ou les phycocyanines.

Des systèmes indirects peuvent être aussi utilisés, comme par exemple des ligands capables de réagir avec un anti-ligand. Les couples ligand/anti-ligand sont bien
 10 connus de l'homme du métier, ce qui est le cas par exemple des couples suivants : biotine/streptavidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le ligand qui porte l'agent de liaison. L'anti-ligand peut être détectable directement par les marqueurs décrits au paragraphe précédent ou être lui-même détectable par un
 15 ligand/anti-ligand.

Ces systèmes de détection indirects peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal. Cette technique d'amplification du signal est bien connue de l'homme du métier, et l'on pourra se reporter aux demandes de brevet antérieures FR98/10084 ou WO-A-95/08000 de la demanderesse ou à l'article J. Histochem.
 20 Cytochem. 45 : 481-491, 1997.

Selon le type de marquage du conjugué utilisé, l'homme du métier ajoutera des réactifs permettant la visualisation du marquage.

A titre d'exemple de tests immunologiques tels que définis ci-dessus, on peut citer les méthodes « sandwich » telles qu'ELISA, IRMA et RIA, les méthodes dites de
 25 compétition et les méthodes d'immunodétection directe comme l'immunohistochimie, le Western-blot et le Dot-blot.

La spectrométrie de masse peut également être utilisée pour la détection directe du NGF dans l'échantillon biologique. Le principe de la spectrométrie est largement connu de l'homme du métier et est décrit par exemple dans Patterson, S., 2000, Mass
 30 spectrometry and proteomics. Physiological Genomics 2, 59-65.

Dans le cas présent, on fait passer l'échantillon biologique sur un support

d'immunocapture, comportant un des partenaires de liaison du NGF, par exemple un anticorps dirigé contre le NGF. L'échantillon biologique ainsi traité est alors passé dans un spectromètre de masse et on compare le spectre obtenu avec celui du NGF.

L'échantillon biologique utilisé pour la détection directe du NGF, susceptible de
5 contenir du NGF en tant que tel, peut être constitué par du fluide biologique ou un tissu provenant de la biopsie de la tumeur ou des métastases du patient considéré.

A titre de fluide biologique, on peut citer le sang, la moelle osseuse, le lait, le liquide céphalo-rachidien, les urines et les épanchements.

Pour la détection du NGF, le fluide biologique, qui constitue un mode de
10 réalisation particulier de l'invention, peut nécessiter un traitement particulier. En effet, le fluide biologique peut contenir le NGF en tant que tel, ou bien il peut contenir des cellules tumorales circulantes qui sont capables de sécréter le NGF.

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention, le fluide biologique est
15 préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes contenues dans le dit fluide.

Le traitement du fluide pour isoler les cellules tumorales circulantes peut être effectué par tri cellulaire dans un cytomètre de flux, par enrichissement par billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques, ou par toute autre méthode d'enrichissement spécifique connue de l'homme du métier.

20 Dans le cas du sang à titre de fluide biologique, les cellules peuvent être isolées grâce à une technique de séparation cellulaire sur Ficoll associée à une déplétion des cellules sanguines utilisant des anticorps anti-CD45 couplés à des billes magnétiques (Dynal Biotech ASA, Norvège).

La détection directe du NGF peut alors être effectuée directement à partir de
25 cellules tumorales circulantes, par exemple en utilisant la méthode de cytométrie de flux telle que décrite dans Métézeau P, Ronot X, Le Noan-Merdrignac G, Ratinaud MH, La cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique (Tome I), Eds Medsi-MacGrawhill.

Dans ces conditions, lesdites cellules circulantes sont traitées lors de leur culture
30 dans des conditions permettant le blocage du NGF à l'intérieur desdites cellules. Un tel traitement est décrit par exemple dans Intracellular Flow Cytometry, Applied reagents

and Techniques, pp 1-21, BD Pharmingen.

La détection du NGF se fait alors après avoir rendu perméable la membrane des cellules pour faire rentrer les partenaires de liaison spécifique du NGF.

La détection directe du NGF à partir des cellules circulantes peut également être effectuée à l'aide du procédé décrit dans la demande de brevet FR02/03136 déposée par l'une des Demanderesses.

La détection directe du NGF dans les cellules tumorales peut encore être effectuée dans le milieu de culture desdites cellules après les avoir cultivées dans des conditions telles qu'elles sécrètent du NGF.

Ces conditions de culture sont des conditions classiques telles que 37°C sous atmosphère humide et à 5% de CO₂.

En revanche, s'agissant du tissu provenant de la biopsie de la tumeur ou des métastases du patient à titre d'échantillon biologique, ce qui constitue un mode de réalisation particulier de l'invention, la détection directe du NGF est effectuée directement sur les coupes obtenues, sans traitement préalable dudit tissu.

Un autre mode de détection de la présence du NGF consiste en la culture, en présence de l'échantillon biologique, de cellules sensibles au NGF, ce qui constitue un mode de réalisation particulier de l'invention.

Dans ce cas, la détection de la présence du NGF dans un échantillon biologique est mise en évidence par la réaction des cellules sensibles au NGF.

Par cellules sensibles au NGF, on entend toute cellule stimulée en présence de NGF (croissance, apoptose, etc.).

A titre de cellules sensibles au NGF, on peut citer les cellules phéochromocytomes PC12 (Hondermarck H. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:9377-81) et les cellules embryonnaires d'origine neuronale (Hattori A., et al., 1993, J. Biol. Chem., 268 :2577-2582).

L'échantillon biologique que l'on peut utiliser pour la détection de la présence du NGF par culture de cellules sensibles au NGF peut être tout échantillon tel que décrit précédemment, à l'exception des tissus de biopsie.

Ainsi, l'échantillon biologique peut être constitué de fluide biologique, le cas échéant préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes, elles-mêmes

pouvant ensuite être cultivées en conditions telles qu'elles sécrètent du NGF, comme décrit précédemment.

Un autre mode de détection de la présence de NGF dans les échantillons biologiques consiste en la détection de l'ARNm du NGF dans ledit échantillon, ce qui
5 constitue un autre mode de réalisation de l'invention.

La détection d'ARNm dans un échantillon liquide est largement connue de l'homme du métier.

Elle peut par exemple être mise en œuvre par des réactions d'hybridation entre l'ARNm cible et un acide nucléique capable de liaison avec l'ARNm cible.

10 On entend par acide nucléique les oligonucléotides, les acides désoxyribonucléiques et les acides ribonucléiques, ainsi que leurs dérivés.

Le terme « oligonucléotide » désigne un enchaînement d'au moins 2 nucléotides (désoxyribonucléotides ou ribonucléotides, ou les deux), naturels ou modifiés, susceptibles de s'hybrider, dans des conditions appropriées d'hybridation, avec un
15 oligonucléotide au moins partiellement complémentaire. Par nucléotide modifié, on entend par exemple un nucléotide comportant une base modifiée et/ou comportant une modification au niveau de la liaison internucléotidique et/ou au niveau du squelette. A titre d'exemple de base modifiée, on peut citer l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine et la bromo-5-désoxyuridine.
20 Pour illustrer une liaison internucléotidique modifiée, on peut mentionner les liaisons phosphorothioate, N-alkylphosphoramidate, alkylphosphonate et alkylphosphodiester. Les alpha-oligonucléotides tels que ceux décrits dans FR-A-2 607 507, les LNA tels que phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA décrits dans Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 8, Issue 16, 18 August 1998, pages 2219-2222, et les PNA
25 qui font l'objet de l'article de M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc. (1992), 114, 1895-1897, sont des exemples d'oligonucléotides constitués de nucléotides dont le squelette est modifié.

La révélation des réactions d'hybridation peut être effectuée par marquage des acides nucléiques de liaison, comme illustré précédemment.

30 Avant hybridation avec l'acide nucléique de liaison, l'ARNm cible peut être amplifié, comme par exemple par RT-PCR ou par NASBA (Maleck, L., et al ;, 1994,

Methods in Molecular Biology, 28, ch 36, Ed P.G. Isaac, Humana Press, Inc., Totowa, NJ).

L'échantillon biologique que l'on peut utiliser pour la détection de la présence du NGF par détection d'ARNm du NGF peut être tout échantillon tel que décrit
5 précédemment.

Ainsi, l'échantillon biologique peut être constitué de tissu issu de biopsie de tumeur ou de métastase, ou bien de fluide biologique, le cas échéant préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes, comme décrit précédemment.

Le procédé de l'invention peut être utilisé tant pour le diagnostic précoce, que
10 pour le dépistage, le suivi thérapeutique et le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer du sein puisque seules les cellules cancéreuses produisent du NGF.

Ainsi, un autre objet de l'invention consiste en l'utilisation du procédé de l'invention dans le diagnostic précoce, le dépistage, le suivi thérapeutique et le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer du sein.

15 Outre un rôle de marqueur tumoral, le NGF peut également avoir un rôle de cible thérapeutique. En effet, du fait de la spécificité de production de NGF par les cellules du cancer du sein, tandis que les cellules normales n'en produisent pas, la prolifération tumorale peut être bloquée par un partenaire de liaison du NGF susceptible de bloquer la prolifération cellulaire ou par un inhibiteur du NGF.

20 Ainsi, la présente invention a également pour objet l'utilisation d'un partenaire de liaison du NGF susceptible de bloquer la prolifération des cellules du cancer du sein ou d'un inhibiteur du NGF pour la préparation d'un médicament utile pour bloquer cette prolifération tumorale chez les patients atteints du cancer du sein.

Les partenaires de liaison spécifiques appropriés sont tels que définis
25 précédemment dans les tests immunologiques.

Selon un mode de réalisation particulier, le partenaire spécifique susceptible de bloquer la prolifération de cellules de cancer du sein est un anticorps anti-NGF.

A titre d'inhibiteur du NGF, on peut citer l'inhibiteur K-252a (Tapley, P., et al., 1992, Oncogene 7, 371-381).

30 L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants donnés à titre illustratif et non limitatif, ainsi qu'à l'aide des figures 1 à 3 annexées, sur lesquelles :

- la figure 1A représente un gel d'électrophorèse mettant en évidence, après RT-PCR, la sécrétion du NGF par les cellules cancéreuses MCF-7, T47D, MDA-MB-231 et BT20 et par les cellules de la glande submaxillaire à titre de témoin, ainsi que l'absence d'une telle sécrétion par les cellules normales NBEC (Normal Breast Epithelial Cells),
- 5 - la figure 1B représente un gel d'électrophorèse mettant en évidence, après immunoblotting, la sécrétion du NGF par les cellules cancéreuses MCF-7, T47D, MDA-MB-231 et BT20 et par les cellules de la glande submaxillaire, ainsi que l'absence d'une telle sécrétion par les cellules NBEC,
- la figure 1C est un graphe donnant la quantité de NGF sécrétée en fonction des
- 10 cellules testées par ELISA, à savoir les cellules cancéreuses MCF-7, T47D, MDA-MB-231 et BT20, les cellules de la glande submaxillaire et les cellules NBEC,
- la figure 2A représente le schéma expérimental de coculture des cellules PC12 (1) se développant en présence de NGF et de cellules cancéreuses (2),
- la figure 2B est constituée de photographies représentant la culture de cellules PC12 à
- 15 titre de témoin (photo 2), la différenciation des cellules PC 12 sous l'influence du NGF (photo 3), la coculture de cellules sensibles au NGF en présence de cellules cancéreuses MCF-7 (photo 4), la culture de cellules cancéreuses MCF-7 en présence d'un anticorps anti-NGF (photo 5), la culture de cellules cancéreuses MCF-7 en présence de l'inhibiteur K252a (photo 6), et la culture de cellules mammaires normales NBEC
- 20 (photo 7) et
- la figure 3A représente un graphe montrant la croissance des cellules MCF-7 en nombre de cellules (10^4 cellules/disque de 35 mm) , soit sans agent de blocage de la prolifération tumorale à titre de témoin, soit en présence de l'anticorps anti-NGF MAB-256, soit en présence de l'inhibiteur K-252a,
- 25 - les figure 3B et 3C représentant des graphes donnant le nombre de cellules MCF-7 en fonction de la dose de l'anticorps MAB-256 (figure 3B) ou de la dose de l'inhibiteur K-252a (figure 3C).

Exemple 1 : Mise en évidence de l'expression du NGF dans des cellules du cancer du sein par RT-PCR

1.1 Cellules testées

On a testé 4 lignées de cellules de cancer du sein humain, à savoir les cellules
5 MCF-7, T47D, MDA-MB-231 et BT20, obtenues auprès de la collection ATCC
(Rockville, MD) sous les numéros HTB-22, HTB-133, HTB-26 et HTB-29,
respectivement.

Ces cellules ont été maintenues dans du milieu essentiel minimal (sel de Earle,
BioWhittaker, Belgique) supplémenté avec de l'HEPES 20 mM, 2 g/l de bicarbonate de
10 sodium, 2 mM de L-glutamine, 10% de sérum de veau fœtal (FCS), 100 unités/ml de
pénicilline-streptomycine, 50 µg/ml de gentamycine, 1% d'acides aminés non essentiels
et 5 µg/ml d'insuline.

A titre de comparaison, on a testé des cellules épithéliales du sein normales
(NBEC) obtenues auprès du Département de Chirurgie Plastique de l'Université
15 Médicale de Lille (Pr. Pellerin, France) qu'on a cultivées dans du milieu DMEM/F12
(1/1) (BioWhittaker) contenant 5% de FCS, 10 UI/ml d'insuline, 5 µM de cortisol,
2 ng/ml de EGF, 100 ng/ml de toxine de choléra, 100 ng/ml de pénicilline et 45 µg/ml
de gentamycine (milieu B1). Lorsque les cellules ont approché la confluence, on les a
placées dans le même milieu, à ceci près qu'on a réduit la concentration en calcium à
20 20 µM.

On a également utilisé les cellules de glande submaxillaire humaine obtenues à
partir de résidus de dissection hospitaliers comme source connue de NGF.

1.2 RT-PCR

On a isolé l'ARN total des lignées de cellules cancéreuses, des cellules NBEC et
25 de la glande submaxillaire humaine (20 mg de poids) en utilisant le kit Rneasy mini
(Qiagen, France). On a mis en œuvre la rupture et l'homogénéisation de la glande
submaxillaire en utilisant un homogénéisateur Rotor-Stator (Bribolyser, Hybaid).

On a quantifié la quantité d'ARN extrait en mesurant l'absorbance à 260 nm et
on a recherché la pureté de l'ARN par le rapport d'absorbance à 260 nm et à 280 nm.
30 On a confirmé l'absence de dégradation de l'ARN par électrophorèse de l'ARN sur un
gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium.

On a réalisé la transcriptase inverse (RT) en ajoutant un mélange réactionnel contenant 2 g d'ARNm total purifié, 1X tampon de réaction, 10 mM de DTT, 400 mM de dNTP chacun, 2,5 M d'oligo(dT), 40 unités de Rnasine et 200 unités de transcriptase inverse de virus de la leucémie murine Moloney à 25 µl de volume réactionnel total.

5 Toutes les réactions ont été incubées à 37°C pendant 1 h, puis inactivées à 95°C pendant 5 min.

La PCR a été mise en œuvre sur les ADNc après RT ou sur les échantillons d'ARN sans l'étape de RT pour les contrôles négatifs comme suit :

A des tubes de PCR, on a ajouté 5 µl de tampon PCR (200 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 10 µl de 15 mM MgCl₂, 1 ml de 10 mM dNTP mix, 1 µl d'ADNc ou d'ARNm total (pour le contrôle négatif), 1 µl de 50 mM des sondes pour le gène *ngf* indiquées ci-dessous, 1 µl de 2,5 unités/µl d'ADN polymérase Taq et de l'eau jusqu'à un volume total de 50 µl.

Sonde sens : 5'-GACAGTGTCAGCGTGTGGGTT-3'

15 Sonde antisens : 5'-CCCAACACCATCACCTCCTT-3'

Les conditions de PCR étaient les suivantes : après traitement à 95°C pendant 3 min pour dénaturer l'ADNc, on a effectué 30 cycles à 94°C pendant 1 min, 57°C pendant 2 min et 72°C pendant 3 min. On a ensuite incubé les tubes de PCR pour 10 min supplémentaires à 72°C pour l'extension des fragments d'ADNc après le cycle final.

La visualisation du matériel amplifié sous lumière UV par coloration au bromure d'éthidium après électrophorèse sur gel d'agarose est représentée sur la figure 1A. Cette figure montre un produit de transcription du *ngf* de 74 pdb pour les cellules épithéliales cancéreuses et les cellules de la glande submaxillaire (témoin positif), alors que ce produit n'est pas détecté pour les cellules NBEC.

Ce test permet donc de mettre en évidence que les cellules cancéreuses sécrètent du NGF, tandis que les cellules épithéliales correspondantes non cancéreuses n'en sécrètent pas.

Exemple 2 : Mise en évidence de l'expression du NGF dans des cellules du cancer du sein par Immunoblotting

2.1 Cellules testées

Les cellules testées sont celles indiquées dans le point 1.1 ci-dessus.

5 **2.2 Immunoblotting**

Les cellules subconfluentes, cultivées comme indiqué dans le point 1.1 ci-dessus, ont été rincées et placées dans un milieu sans sérum contenant de la fibronectine et de la transferrine pendant 24 h. Après les avoir privées de nutriments, les cellules ont été collectées par raclage dans du tampon PBS (solution saline tamponnée au phosphate) et on les a soumises à une centrifugation (1000×g, 5 min).

On a traité le culot avec du tampon de lyse (10% SDS, 0,5% de β-mercaptoéthanol, 0,5M Tris HCl pH 6,8, 25% glycérol, 0,5%) et on a mis à bouillir 5 min à 100°C.

Après centrifugation (1000×g, 5 min), on a recherché les protéines des surnageants en utilisant les tests de détermination de protéines de Bio Rad.

On a soumis à SDS-PAGE les lysats provenant de chaque lignée cellulaire et de la glande submaxillaire, on les a transféré sur une membrane de nitrocellulose par électroblotting (200 mA, 45 min).

On a ensuite testé chaque membrane avec un anticorps polyclonal de lapin anti-NGF (sc-548, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, France) à 4°C toute la nuit. On a rincé chaque membrane à trois reprises avec du tampon TBS-T, puis on les a incubées à température ambiante pendant 2 h avec un anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à la peroxydase de raifort (Molecular Probes). On a rincé chaque membrane à quatre reprises avec du tampon TBS-T et on a révélé la réaction en utilisant le kit de chimiluminescence ECL (Amersham Pharmacia Biotech) avec le film AR X-Omat de Kodak.

Là-encore, comme représenté sur la figure 1B, du NGF a été détecté avec les cellules cancéreuses et la glande submaxillaire (bande à 14 kDa), tandis que cette bande était absente pour les cellules non cancéreuses.

30 Ce résultat confirme celui de l'exemple 1.

Exemple 3 : Mise en évidence de l'expression du NGF dans des cellules du cancer du sein par ELISA

3.1 Cellules testées

Les cellules testées sont celles indiquées dans le point 1.1 ci-dessus.

5 **3.2 ELISA**

Pour ce test, on a utilisé un test à deux sites pour du β -NGF humain. En résumé, on a revêtu des immunoplaques de 1 μ g/ml d'anticorps monoclonal de capture (R&D Systems, UK) dilué dans un tampon de dilution (0,1% BSA, 0,005% Tween 20 dans une solution saline tamponnée au Tris pH 7,3). On a revêtu les puits contrôles de la même quantité d'IgG de souris (R&D Systems). Chaque puits a reçu 100 μ l de cette dilution et les plaques ont été scellées et incubées à la température ambiante, toute la nuit.

On a lavé les puits à trois reprises avec 400 μ l de PBS, pH 7,4, contenant 0,05% de Tween 20. On a ensuite bloqué les plaques à la température ambiante en utilisant 1% de sérum albumine bovine, 5% de saccharose et 0,005% de NaN_3 dans le même tampon.

Après 2 h, on a lavé chaque puits, on a appliqué des dilutions de produits inconnus et standards dans un volume de 100 μ l, et on a recouvert les plaques d'une bande adhésive et on les a incubées à température ambiante toute la nuit.

20 On a utilisé du β -NGF humain (R&D Systems) comme échantillon standard à raison de 0,25 à 8 ng/ml dans 100 μ l du tampon de dilution.

On a ensuite lavé les plaques de façon extensive et on a ajouté l'anticorps de détection IgG de chèvre spécifique anti- β -NGF humain (BAF-256, R&D Systems) à raison de 50 ng/ml avant incubation pendant 2 h à température ambiante.

25 Après incubation, on a lavé les immunoplaques à trois reprises avec du tampon de lavage et on a ajouté 100 μ l de streptavidine/péroxydase de raifort pour une incubation de 20 min à la température ambiante.

La réaction a commencé par ajout de 100 μ l d'une solution substrat pendant 30 min d'incubation à la température ambiante et à l'obscurité.

Après cette durée, on a ajouté 50 µl d'une solution stop (H₂SO₄ 1M) dans chaque puits. On a déterminé la densité optique en 30 min en utilisant un ensemble de lecture de microplaque à 595 ou 450 nm.

Les résultats de densité optique (moyenne de 3 tests indépendants) sont donnés sur la figure 1C. Ils mettent en évidence un niveau similaire de NGF dans toutes les lignées de cellules du cancer du sein testées.

Exemple 4 : Culture de cellules sensibles au NGF

Pour ce faire, on a cocultivé des cellules qui se développent en présence de NGF, à savoir les cellules PC12, avec des cellules de cancer du sein MCF-7, telles que décrites dans le point 1.1 ci-dessus, ou bien avec des cellules NBEC, telles que décrites dans le point 1.1 ci-dessus, à titre de témoin.

Les cellules PC12 ont été cultivées au préalable à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂, dans du milieu essentiel minimal modifié de Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 3 g/l de bicarbonate de sodium, 4 mM de L-glutamine, 10% de sérum de veau foetal, 5% de sérum de cheval et 100 unités/ml de pénicilline/streptomycine.

La coculture a été réalisée avec des plaques de polycarbonate traitée à la culture tissulaire Transwell® (12 mm de diamètre et 12 µm de taille de pore). Une période d'équilibre initial a été observée en ajoutant les milieux au puits central de la plaque, puis à l'insert du Transwell®, opération suivie d'une incubation à 37°C pendant 3 h.

Les cellules PC12 ont étéensemencées dans des plaques à 12 puits revêtues de collagène pendant 24 h pour assurer une fixation correcte aux plaques de culture. On aensemencé les cellules MCF-7 ou NCBE à l'intérieur de l'insert du Transwell®, correspondant au compartiment supérieur dans le milieu complet pendant 24 h.

Après ce temps, on a rincé chaque lignée cellulaire à trois reprises avec un milieu dénué de sérum et on les a incubées dans un milieu de retrait. Dans les expériences témoins, le milieu a été supplémenté avec du milieu contenant soit du NGF, soit un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase trk (K-252-a, Calbiochem, France), soit de l'anticorps monoclonal de souris anti-β-NGF humain (MAB-256, R&D Systems).

La coculture a été réalisée pendant 48h. Après ce délai, les cellules PC12 ont été fixées avec du méthanol froid (-20°C) pendant 20 min, puis lavées avec une solution

saline tamponnée au phosphate (PBS) avant assemblage avec des lamelles couvre-objet et du Glycergel (Dako, France).

On a compté le pourcentage de cellules portant des neurites définies comme des cellules avec un ou plusieurs prolongements neuritiques ayant au moins deux fois la longueur du corps de la cellule. On a également pris des photomicrographies à l'aide d'un microscope à contraste de phase supplémenté avec une caméra digitale optique Olympus.

Les résultats sont donnés sur la figure 2, sur laquelle :

- la figure 2A montre le schéma expérimental où 2 correspond aux cellules cancéreuses ou non cancéreuses et 1 correspond aux cellules PC12,
- les photos 2 et 3 montrent la culture des cellules PC12 à titre de témoin, respectivement sans NGF et en présence du NGF où on observe alors un développement de neurites dû à la différenciation,
- la photo 4, qui concerne la coculture des cellules MCF-7 et PC12, montre que les cellules PC12 se sont différenciées après 48 h de culture
- la photo 5, qui concerne la coculture des cellules MCF-7 et PC12 en présence de l'anticorps anti-NGF, montre une inhibition forte de la différenciation des cellules PC12 du fait de l'anticorps,
- la photo 6, qui concerne la coculture des cellules MCF-7 et PC12 en présence de l'inhibiteur K-252a, montre une inhibition forte de la différenciation des cellules PC12 du fait de l'inhibiteur, et
- la photo 7, qui concerne la coculture des cellules normales NBEC et PC12, met en évidence l'absence de différenciation des cellules PC12.

Exemple 5 : Influence d'un anticorps anti-NGF et d'un inhibiteur pharmacologique sur la croissance des cellules cancéreuses

On a étudié l'effet de l'anticorps de blocage MAB-256 (supra) et de l'inhibiteur K-252a sur la croissance des cellules MCF-7. Pour ce faire, on aensemencé les cellules à raison de 2×10^4 cellules/ml dans des boîtes de 35 mm dans du milieu complet. Après avoir atteint 40% de confluence, on a lavé les cellules à deux reprises et on les a laissées sans nutriments dans un milieu dénué de sérum contenant de la fibronectine (2 µg/ml) et de transferrine (30 µg/ml) pendant 3 h. L'heure d'après, on a remplacé le

milieu par 2 ml du même milieu contenant l'inhibiteur K-252a ou l'anticorps MAB-26 à différentes concentrations afin d'étudier l'effet de l'inhibiteur pharmacologique ou de l'inhibiteur de blocage sur le niveau basal de croissance.

Après 24, 36, 48 et 72 h de traitement, on a déterminé le nombre de cellules après trypsinisation de la culture monocouche avec une solution de 0,25% trypsine/EDTA en utilisant un hémocytomètre.

On a également utilisé un anticorps monoclonal anti-mousse (A4700, SIGMA), c'est-à-dire non pertinent, pour déterminer la spécificité de l'anticorps de blocage.

Les résultats sont indiqués sur la figure 3 sur laquelle :

- 10 - la figure 3A montre que la croissance des cellules MCF-7 en milieu de base (carrés) diminue en présence d'anticorps (triangles) et d'inhibiteur (losanges),
- les figures 3B et 3C montrent qu'il y a un effet dose de l'anticorps et de l'inhibiteur, respectivement, sur l'effet prolifératif du NGF pour les cellules cancéreuses.

Le NGF peut donc bien être utilisé à titre de cible thérapeutique.

REVENDICATIONS

1. Procédé de diagnostic *in vitro* du cancer du sein, caractérisé en ce qu'il
5 consiste à déterminer la présence de NGF dans un échantillon biologique issu d'un patient suspecté d'être atteint du cancer du sein.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la présence de NGF est
mise en évidence par détection directe du NGF dans ledit échantillon biologique.

10

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la détection du NGF
est mise en œuvre par un test immunologique ou par spectrométrie de masse.

4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que ledit
15 échantillon biologique est constitué de fluide biologique ou d'un tissu provenant de la biopsie de la tumeur ou de métastases.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'échantillon
biologique est constitué d'un tissu provenant de la biopsie de la tumeur ou des
20 métastases du patient.

6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'échantillon
biologique est constitué de fluide biologique.

25 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le fluide biologique est
préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes contenues dans ledit
fluide.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules tumorales
30 circulantes sont ensuite cultivées en conditions telles qu'elles sécrètent du NGF.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de diagnostic *in vitro* du cancer du sein, caractérisé en ce qu'il
5 consiste à déterminer la présence de NGF dans un échantillon biologique issu d'un
patient suspecté d'être atteint du cancer du sein.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la présence de NGF est
mise en évidence par détection directe du NGF dans ledit échantillon biologique.

10

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la détection du NGF
est mise en œuvre par un test immunologique ou par spectrométrie de masse.

4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que ledit
15 échantillon biologique est constitué de fluide biologique ou d'un tissu provenant de la
biopsie de la tumeur ou de métastases.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'échantillon
biologique est constitué d'un tissu provenant de la biopsie de la tumeur ou des
20 métastases du patient.

6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'échantillon
biologique est constitué de fluide biologique.

25 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le fluide biologique est
préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes contenues dans ledit
fluide.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les cellules tumorales
30 circulantes sont ensuite cultivées en conditions telles qu'elles sécrètent du NGF.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les cellules tumorales circulantes sont également cultivées dans des conditions permettant le blocage du NGF à l'intérieur desdites cellules.

5 10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la détection de NGF est mise en évidence par culture, en présence dudit échantillon biologique, de cellules sensibles au NGF.

10 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit échantillon biologique est constitué d'un échantillon de fluide biologique.

12 Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le fluide biologique est préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes contenues dans ledit fluide.

15 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que les cellules tumorales circulantes sont ensuite cultivées en conditions telles qu'elles sécrètent du NGF.

20 14. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la détection de NGF est mise en évidence par détection de l'ARNm du NGF dans ledit échantillon biologique.

25 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit échantillon biologique est constitué d'un échantillon de fluide biologique ou d'un tissu provenant de la biopsie de la tumeur ou des métastases du patient.

30 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est constitué d'un tissu provenant de la biopsie de la tumeur ou des métastases du patient.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les cellules tumorales circulantes sont également cultivées dans des conditions permettant le blocage du NGF à l'intérieur desdites cellules.

5 10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la détection de NGF est mise en évidence par culture, en présence dudit échantillon biologique, de cellules sensibles au NGF.

10 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit échantillon biologique est constitué d'un échantillon de fluide biologique.

15 12 Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le fluide biologique est préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes contenues dans ledit fluide.

 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que les cellules tumorales circulantes sont ensuite cultivées en conditions telles qu'elles sécrètent du NGF.

20 14. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la détection de NGF est mise en évidence par détection de l'ARNm du NGF dans ledit échantillon biologique.

25 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit échantillon biologique est constitué d'un échantillon de fluide biologique ou d'un tissu provenant de la biopsie de la tumeur ou des métastases du patient.

30 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est constitué d'un tissu provenant de la biopsie de la tumeur ou des métastases du patient.

17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est constitué de fluide biologique.

5 18 Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que le fluide biologique est préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes contenues dans ledit fluide.

19. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 dans le diagnostic précoce, le dépistage, le suivi thérapeutique et le diagnostic des
10 rechutes dans le cadre du cancer du sein.

20. Utilisation d'un partenaire de liaison du NGF susceptible de bloquer la prolifération des cellules du cancer du sein ou d'un inhibiteur du NGF pour la préparation d'un médicament utile pour bloquer cette prolifération tumorale chez les
15 patients atteints du cancer du sein.

21. Utilisation selon la revendication 20, caractérisé en ce que le partenaire de liaison du NGF est un anticorps anti-NGF.

17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est constitué de fluide biologique.

5 18 Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que le fluide biologique est préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes contenues dans ledit fluide.

10 19. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 dans le diagnostic précoce, le dépistage, le suivi thérapeutique et le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer du sein.

Fig 1A

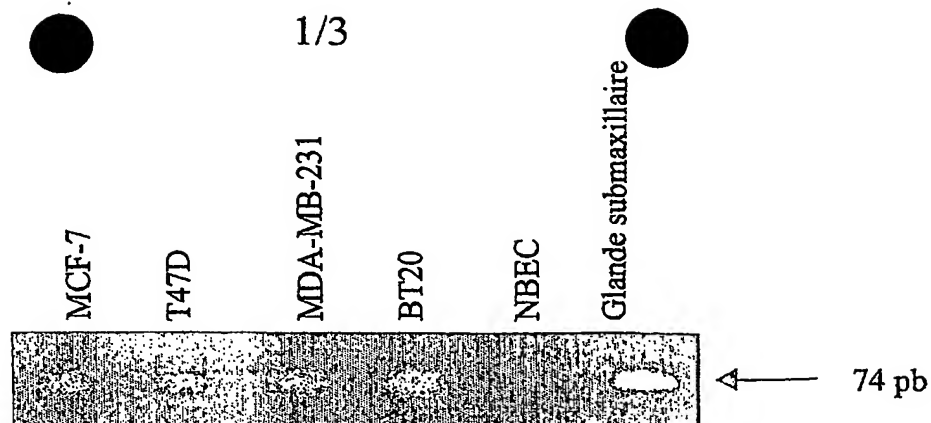


Fig 1B



Fig 1C

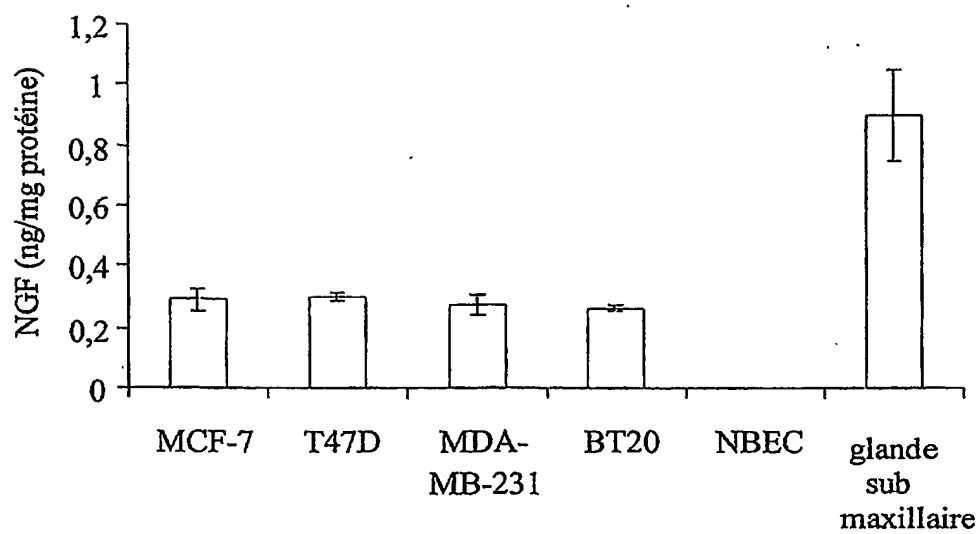


Figure 1

Fig 2A

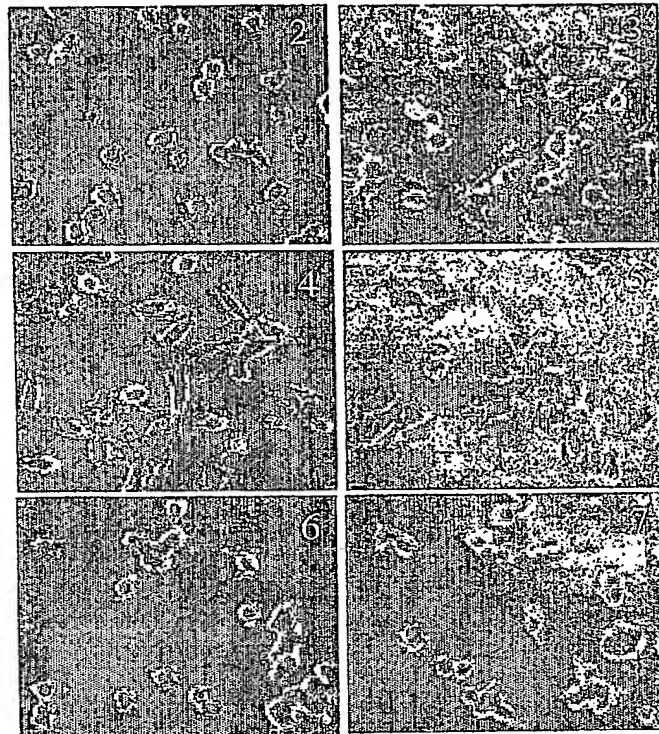
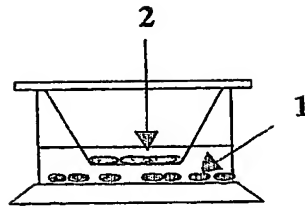


Figure 2

Fig 3A

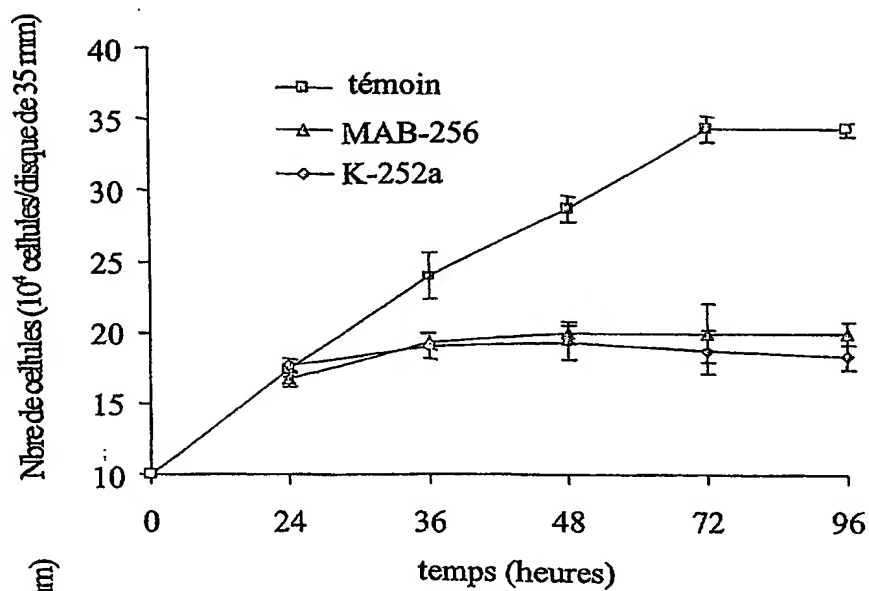


Fig 3B

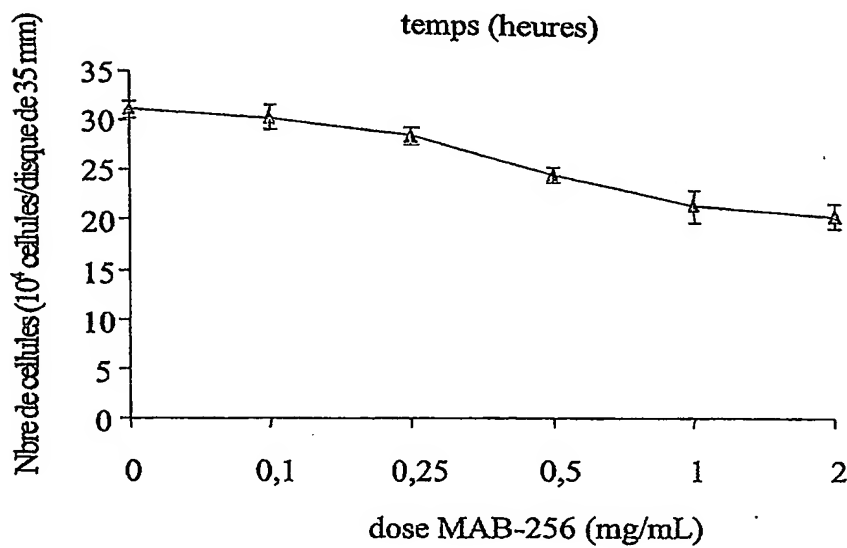


Fig 3C

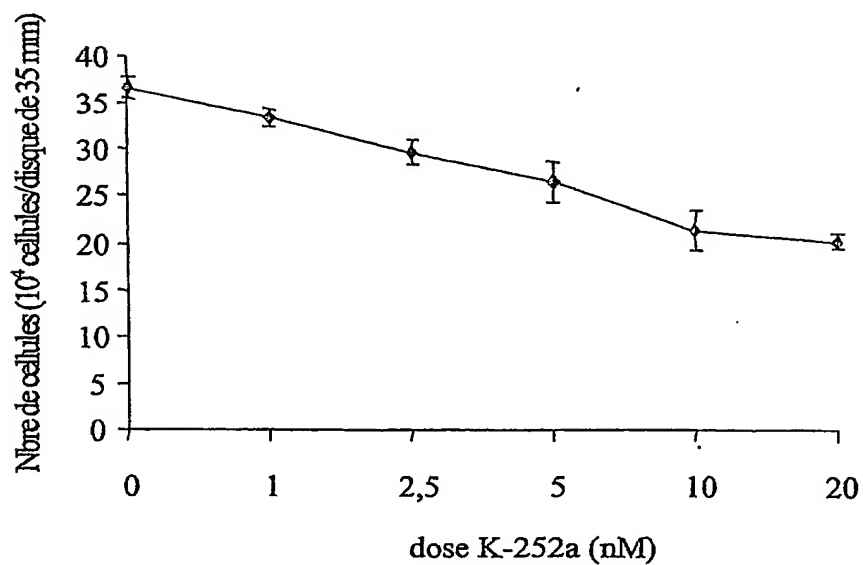


Figure 3



BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		NGFdose
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 13428
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE DOSAGE DU NGF POUR LE DIAGNOSTIC IN VITRO DU CANCER DU SEIN ET UTILISATION EN THERAPIE		
LE(S) DEMANDEUR(S) : - bioMérieux - Chemin de l'Orme, 69280 MARCY L'ETOILE, FRANCE - Université des Sciences et Technologies de Lille - Laboratoire de Biologie du Développement, 59655 VILLENEUVE D'ASCQ, FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> 1 Nom		CHOQUET-KASTYLEVSKY
Prénoms		Geneviève
Adresse	Rue	28 avenue du Bois
	Code postal et ville	69150 BRON
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 2 Nom		HONDERMARCK
Prénoms		Hubert
Adresse	Rue	59 allée de Touraine
	Code postal et ville	59655 VILLENEUVE D'ASCQ
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 3 Nom		DOLLÉ
Prénoms		LAURENT
Adresse	Rue	2/45 chemin des tisserands batiment tramontane
	Code postal et ville	59655 VILLENEUVE D'ASCQ
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
25 Octobre 2002 Valérie BITAUD Ingénieur Brevets PG 10872		



BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI


N° 11235°03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

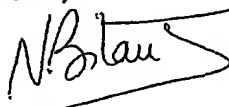
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		NGFdose
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		Q2 13428
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE DE DOSAGE DU NGF POUR LE DIAGNOSTIC IN VITRO DU CANCER DU SEIN ET UTILISATION EN THERAPIE		
LE(S) DEMANDEUR(S) : - bioMérieux - Chemin de l'Orme, 69280 MARCY L'ETOILE, FRANCE - Université des Sciences et Technologies de Lille - Laboratoire de Biologie du Développement, 59655 VILLENEUVE D'ASCQ, FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		ADRIAENSSENS
Prénoms		Eric
Adresse	Rue	23 rue Émile Zola
	Code postal et ville	59121 SAULZOIR
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		EL-YAZIDI BELKOURA
Prénoms		Ikram
Adresse	Rue	11 allée de la comédie
	Code postal et ville	59655 VILLENEUVE D'ASCQ
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
25 Octobre 2002 Valérie BITAUD Ingénieur Brevets PG 10872 		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.